ПАРАЗИТОЛОГИЯ, VIII, 5, 1974

УДК 593.195

ВЛИЯНИЕ УФ ОБЛУЧЕНИЯ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ СПОР МИКРОСПОРИДИЙ PLISTOPHORA SCHUBERGI ZWÖLFER И NOSEMA AGROTIDIS LIPA ET ISSI

Г. Н. Нилова и Л. В. Стрельникова

Институт зоологии и паразитологии АН Таджикской ССР, Душанбе

Проведено облучение спор *Plistophora schubergi* и *Nosema agrotidis* УФ лучами в различной экспозиции. С увеличением дозы радиации количество выживших спор уменьшилось. Споры *P. schubergi* оказались менее резистентными к УФ облучению, чем споры *N. agrotidis*.

Ультрафиолетовые лучи как часть солнечного спектра воздействуют как на одноклеточные, так и на многоклеточные организмы. Они обладают сильным бактерицидным и мутагенным действием, вызывают нарушения обмена веществ.

По простейшим большинство работ посвящено действию ультрафиолетовых лучей на активные стадии инфузорий. Установлено, что под влиянием УФ лучей у них нарушалась способность к делению; при высоких дозах облучения наступала гибель (Hollaender, 1955; Самойлова, 1963, 1963а). Наблюдались также структурные изменения в цитоплазме клеток инфузорий (Машанский и Самойлова, 1964; Самойлова, 1967). Наиболее чувствительны к ультрафиолету трофонты. Цисты покоя обладали большей устойчивостью, которая увеличивалась с их возрастом (Лозина-Лозинский и Успенская, 1971). У амеб наблюдалась различная восприимчивость к ультрафиолету даже среди особей одного клона (Вихтерман, 1969).

Таким образом, ультрафиолетовые лучи оказывают глубокое влияние на одноклеточные организмы, вызывая задержку деления, питания, движения и нарушая обмен веществ.

Мы исследовали действие ультрафиолетового облучения на споры микроспоридий *Plistophora schubergi* Zwölfer и *Nosema agrotidis* Lipa et Issi, паразитирующих в озимой совке (*Agrotis segetum* Schiff.) и совершенно не изученных в этом отношении. Микроскопиридии являются одним из агентов микробиологической борьбы. В связи с этим встает вопрос о выживаемости спор в природных условиях, о влиянии на них различных физических факторов, одним из которых является ультрафиолетовая радиация.

В опытах использовалась чистая суспензия спор микроспоридий в дистиллированной воде, полученная путем растирания гусениц озимой совки и последующего 3-кратного центрифугирования гомогената по 15 мин. при 6 тыс. об./мин. Источником ультрафиолетовой радиации при облучении суспензии спор служила прямая ртутно-кварцевая лампа ПРК-2. Суспензию в количестве 2 мл наливали в чашки Петри и помещали под прямое действие ультрафиолетовых лучей на расстоянии 50 см от нити накаливания лампы. Измерение радиации проводилось радиационным термоэлементом ЛЭТИ системы Козырева в паре с гальванометром ГСА-1. Градуировка прибора проводилась по контрольному пиранометру. Учет поправок на температуру и облученность осуществлялся по формулам авторов.[1] При изменении времени экспозиции облучения от 2 до 150 мин. в 22 вариантах опытов споры были облучены дозами ультрафиолетовой радиации от 136.8 до 10 260.0 эрг/см². Исследования по действию ультрафиолетовых лучей на суспензию спор проводили двумя способами: люминесцентным микроскопированием и биологическим тестом.

1. Для дифференциации здоровых и погибших в результате облучения спор использовали люминесцентную микроскопию. Приготовление красок и препаратов проводили по методике Шахматова (1968). Из набора красителей мы выбрали акридиновый оранжевый. Препарат флюорохромировался 3—5 мин. Наблюдения проводили под люминесцентным микроскопом МЛ-2, с объективом 90×, окуляром 15×, со светофильтрами ФС-1, СЗС-7, БС-8. Живые споры светились зеленовато-желтым цветом с ядром розового цвета, погибшие споры окрашивались в красно-оранжевый цвет без дифференциации ядра и цитоплазмы.[2]

2. Вторым методом определения жизнеспособности спор микроспоридий, подверженных действию УФ лучей, был биологический. Гусеницам озимой совки 3—4 летнего возраста скармливали листья, смоченные суспензией спор, облученных УФ лучами. Этот метод по сравнению с люминесцентным был длительным, от 6—10 до 85 дней. Каждый вариант опыта имел 3 повторности, по 10 гусениц в каждой.

1. ДЕЙСТВИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОЙ РАДИАЦИИ НА СПОРЫ PLISTOPHORA SCHUBERGI

Рассматривая под люминесцентным микроскопом суспензию спор *P. schubergi*, облученную ультрафиолетом в течение 2, 4, 6, 8, 10 мин. что соответствует дозам — 136.8; 273.6; 410.4; 547.2; 684.0 эрг/см², мы не заметили разницы в свечении спор микроспоридий при сравнении облученной и необлученной суспензий. Споры в основном были зелеными, со светящимися ядрами. Погибших спор насчитывалось 2—3%. При облучении дозами 547.2 и 684.0 эрг/см² красных спор несколько больше, около 5%.

На рисунке (кривая *2*) изображена зависимость выживаемости гусениц от дозы ультрафиолета (136.8—684 эрг/см²), полученной спорами. Скармливание облученной суспензии вызвало гибель от микроспоридиоза в среднем 89% гусениц. Попадание спор микроспоридий в организм гусениц способствовало развитию ранее скрытой инфекции, от которой они погибали: 11% гусениц погибло от бактериоза и гранулеза. Следовательно, общая гибель гусениц была равна 100%. На рисунке показана гибель гусениц только от микроспоридиоза. Заметим, что по сравнению с контролем даже сравнительно невысокие дозы радиации снижают жизнеспособность спор, так как время гибели гусениц увеличилось почти вдвое.

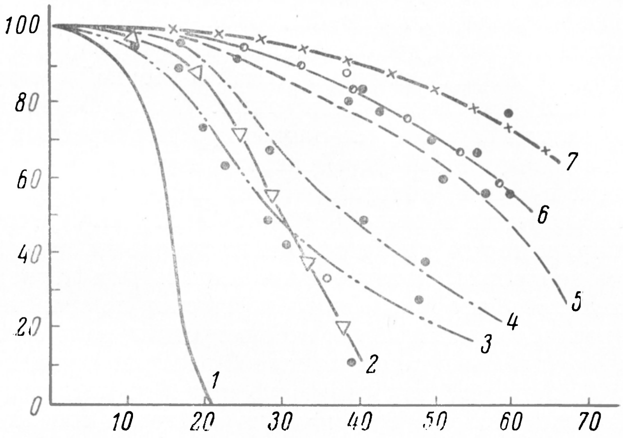
Облучение в дозах 820 эрг/см², 1026 эрг/см², 1368 эрг/см² вызвало гибель около 15% спор. Под люминесцентным микроскопом около 80% спор было зелеными, со светящимися ядрами, но красных и оранжево-красных здесь уже 10—20%, некоторые из них удлиненной формы, слегка изогнуты. На рисунке (кривая *3*) видна выживаемость гусениц (больных микроспоридиозом) при заражении спорами, облученными в дозе 820.8—1368 эрг/см²; при этом 81% спор *P. schubergi* были живыми. Кривая *4* отражает выживаемость гусениц, которым скармливалась суспензия спор, облученная дозами 2052.0 эрг/см², 3078 эрг/см² (30 и 45 мин.); при этом наблюдалось 78% жизнеспособных спор, но по сравнению с контролем период гибели гусениц увеличился на 38 дней. Происходит это, по-видимому, из-за уменьшения живых спор в суспензии.

---

[1] Измерение радиации производилось старшим инженером Института физиологии растений и биофизики АН Таджикской ССР В. И. Музыка, за что мы приносим ему благодарность.

[2] Мы признательны Г. Н. Шахматову, старшему научному сотруднику ИЗИП АН Таджикской ССР, за помощь и ценные советы в работе.

Мы предполагаем, что ультрафиолетовое облучение вызывает ультрафиолетовую болезнь микроспоридий, подобную описанной другими авторами для инфузорий (Насонов и Александров, 1940; Самойлова, 1967). Специфика действия ультрафиолетовых лучей на инфузорий заключается в особом характере вызываемых ими изменений функциональной активности клеток (снижение—подъем—снижение) и длительном эффекте последействия. В наших опытах наблюдалось усиление или уменьшение интенсивности гибели гусениц, что отражало изменения в функциональной активности клеток. Например, при облучении спор дозой 2052 эрг/см^2 гибель гусениц на 24-й день равнялась 24%; затем за 3 дня (на 27-й день) гибель составляла уже 51%. Далее следует спад интенсивности гибели гусениц: на 50-й день — 75% и на 60-й — 78%.



Выживаемость гусениц, зараженных спорами *Plistophora schubergi*, облученными УФ лучами в различных дозах.

1 — необлученный контроль; *2* — доза 136.8—684 эрг/см^2; *3* — доза 820.8—1368 эрг/см^2; *4* — доза 2052—3078 эрг/см^2; *5* — доза 8208—10 260 эрг/см^2; *6* — доза 6156 эрг/см^2; *7* — доза 4104 эрг/см^2. *По оси абсцисс* — дни опыта; *по оси ординат* — гибель гусениц (в %).

Так как покоящиеся стадии простейших более устойчивы, чем развивающиеся к действию всех экстремальных факторов, в том числе и к УФ излучению, то существенную роль в защите спор от неблагоприятных воздействий может играть их оболочка. Кроме того, высокую устойчивость спор к ультрафиолетовым лучам связывают с особенностями их нуклеинового обмена.

Устойчивость спор *P. schubergi* к ультрафиолетовой радиации проявилась также при воздействии на них больших доз УФ облучения. Как видно из рисунка, облучение УФ лучами в дозе 4104 эрг/см^2 суспензии спор *P. schubergi* (кривая *7*) привело к снижению их летального эффекта на 35%. В облученной суспензии под люминесцентным микроскопом оранжево-красных спор было около 30—40%. При больших дозах УФ облучения нами наблюдалась также деформация погибших спор. Так, в данном варианте погибшие споры оказались удлиненными или изогнутыми, некоторые были грушевидной формы.

Облучение ультрафиолетом в дозе 5130 эрг/см^2 (75 мин.) привело к гибели от микроспоридиоза 5% гусениц; остальные 95% окуклились. Из нескольких куколок вылетели бабочки, но яиц не отложили. Во всех погибших куколках были найдены споры. Бабочки по сравнению со здоровыми были меньших размеров, однокрылые или бескрылые. При облучении суспензии спор ультрафиолетом в дозе 6156.0 эрг/см^2 (90 мин.) (см. рисунок, кривая *6*) наблюдалось значительное снижение летального эффекта спор — до 48%. Предполагаем, что ЛД$_{50}$ для спор *P. schubergi* составляет 6000 эрг/см^2.

После облучения в дозах 8208 и 10260 эрг/см² (120 и 150 мин.) мы наблюдали еще большее снижение летального эффекта спор, который равен 73—77% (см. рисунок, кривая *5*). Период гибели гусениц растянут на 40 дней. Оставшиеся особи окуклились, но 30% куколок погибло. Из остальных вылетели бабочки, которые попарно были рассажены в садки в следующих вариантах: ♀♀ здоровые × ♂♂, облученные в течение 90 и 120 мин.; ♀♀ и ♂♂ облученные в течение 90, 120 и 150 мин.; ♀, облученная 150 мин. × ♂ здоровый. Во всех вариантах бабочки отложили небольшое количество (от 10 до 60) яиц, здоровые самки откладывают 300—1200 яиц, почти все яйца оказались стерильными. Из некоторых отродились гусеницы, но погибли в I—II стадии от микроспоридий, переданных трансовариально.

Суспензия спор, облученная УФ радиацией в дозе 10260 эрг/см², при люминесцентной микроскопии представляла следующую картину: бóльшая часть спор была красной, но были споры, каких ранее не наблюдали — с розово-красной светящейся оболочкой и зеленоватым содержимым. Возможно, что эта доза радиации разрушающе действует на оболочку спор. Другие споры с огненно-красной оболочкой и темно-коричневым содержимым были безусловно погибшими. Около 5—10% спор светились зеленым цветом и были, по-видимому, неповрежденными, что говорит об их исключительной устойчивости к ультрафиолету.

Из погибших гусениц, которым скармливалась суспензия спор, облученная ультрафиолетом в течение 60—75 мин., мы приготовили новую суспензию спор, которую снова скормили здоровым гусеницам (2-й пассаж) в той же дозировке, которая применялась для первого заражения. При этом выяснилось, что жизнеспособность спор по сравнению с первым пассажем возросла, так как процент гибели гусениц мало отличался от контроля. Но период гибели гусениц почти в 2 раза увеличился по сравнению с контролем. Суспензию, используемую для 2-го пассажа, мы облучили до заражения дозой 10260.0 эрг/см² и просмотрели под люминесцентным микроскопом. Картина резко отличалась от той, которую мы наблюдали при первом облучении суспензии этой же дозой: не было спор с огненной оболочкой и темным ядром и спор с розово-красной оболочкой и зеленоватым содержимым. Красных и желто-оранжевых спор было около 50%, остальные были зелеными с розовато-красным ядром, т. е. сохранившие свою жизнеспособность.

Последний вариант опыта не был проверен биологическим путем. Однако полученные ранее данные по люминесцентной диагностике облученных спор не расходились с данными биологических вариантов, поэтому мы можем уверенно сказать, что после облучения УФ лучами выживали наиболее устойчивые споры, и таким образом произошел отбор наиболее резистентных к ультрафиолетовому излучению спор. Такие споры, конечно, будут более эффективны для использования в полевых условиях.

2. ДЕЙСТВИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫХ ЛУЧЕЙ НА СПОРЫ NOSEMA AGROTIDIS

Влияние ультрафиолета на споры *N. agrotidis* выражено в проценте гибели зараженных ими гусениц озимой совки. Гусениц, выживших после заражения облученными спорами, было мало, но в отличие от необлученного контроля гибель их удлинялась во времени.

Облучение дозой 136.8 эрг/см² не вызывало заметного эффекта: наблюдалась 100% гибель гусениц на 25-й день. По-видимому, эта доза не достаточна для нарушения биологической структуры цитоплазмы и нуклеинового обмена в спорах *N. agrotidis*. Облучение дозой 1026 эрг/см² вызывает удлинение периода гибели гусениц на 12, а доза 2052 эрг/см² — на 19 дней.

В результате действия ультрафиолетового излучения на споры *N. aqrotidis* в дозе 4104 и 6156 эрг/см² период гибели гусениц удлинился на 15—20 дней, интенсивно возросла их гибель на 14—16-й день, спад которой не наблюдался. Уже на 38-й день споры, облученные УФ в дозе

6156.0 эрг/см^2, вызвали гибель 80% гусениц от микроспоридиоза. После облучения спор дозой 4104 эрг/см^2 погибло от микроспоридиоза 96% гусениц за более продолжительный промежуток времени — 46 дней. 78% гусениц погибло после облучения спор УФ лучами в дозе 8208 эрг/см^2. Одновременно удлиняются сроки гибели гусениц, что говорит о частичном губительном действии ультрафиолета в такой дозе на споры.

Облучение суспензии спор в дозе 10.260 эрг/см^2 явно снижает жизнеспособность спор, так как только 45% гусениц погибло от микроспоридиоза. Из 30% окуклившихся вылетели бабочки, но яиц не отложили.

Используя уравнение Пуассона, мы рассчитали кривые дозаэффекта для двух вариантов. В результате расчетов экстраполяционное число «п» для *P. schubergi* равно 3, для *N. agrotidis* — 15. Таким образом, споры *N. agrotidis* более устойчивы к ультрафиолетовому облучению, чем споры *P. schubergi*. Все вышеизложенное позволяет нам сделать следующие выводы:

1. Споры *P. schubergi* и *N. agrotidis* являются устойчивыми к ультрафиолетовой радиации. При облучении спор дозами от 136.8 эрг/см^2 до 10.260 эрг/см^2 полной гибели спор ни в одном варианте нами не получено.

2. С увеличением дозы радиации снижалась жизнеспособность спор. Для *P. schubergi* ЛД$_{50}$ равна 6000 эрг/см^2, для *N. agrotidis* ЛД$_{50}$ — 10.000 эрг/см^2.

3. После облучения спор микроспоридий *P. schubergi* гибель озимой совки от микроспоридиоза наблюдалась в разных стадиях развития: а) облучение спор дозами до 4.104 эрг/см^2 вызывало гибель совки на стадии гусениц, сроки гибели гусениц соответственно удлинялись; б) облучение спор дозой 5.130 эрг/см^2 вследствие понижения жизнеспособности спор дало возможность зараженным насекомым развиваться до куколок и бабочек; в) после облучения спор в дозах 6.156, 8.208, и 10.260 эрг/см^2 наблюдалось развитие насекомых до гусениц I—III стадии следующего поколения.

4. В результате облучения ультрафиолетом можно отобрать наиболее устойчивые к нему формы спор и повысить их выживаемость в природных условиях.

По данным Кондратьева (1954), энергия УФ части солнечного спектра составляет 0.0000021—0.0000071 эрг/см^2. Примененные нами в лабораторных исследованиях дозы ультрафиолетового облучения во много раз больше природного излучения, поэтому споры микроспоридий можно использовать в полевых условиях без сомнения в том, что естественная ультрафиолетовая радиация вызовет их полную или значительную гибель.

5. Мы предполагаем, что предварительным облучением спор в лабораторных условиях до использования суспензии спор микроспоридий в полевых условиях против вредителей можно произвести отбор наиболее устойчивых к ультрафиолетовой радиации форм.

Литература

Вихтерман Р. В. 1969. Некоторые проблемы, связанные с исследованием биологического действия ионизирующей радиации на простейших. Усп. протозоол., Л., 3 : 16—18.

Лозина-Лозинский Л. К. и Успенская З. И. 1971. Действие ультрафиолетового излучения на почвенные инфузории. В сб.: Ультрафиолетовое излучение, М., 5 : 104—110.

Машанский В. Ф. и Самойлова К. А. 1964. Действие ультрафиолетовой радиации на ультраструктуры клетки. Цитология, 6 (1) : 59—65.

Кондратьев К. Я. 1954. Лучистая энергия Солнца. Л. : 205—211.

Насонов Д. Н. и Александров В. Я. 1940. Реакция живого вещества на внешние воздействия. Изд. АН СССР, М.—Л. : 1—20.

Самойлова К. А. 1963. Изменения в содержании жира и гликогена у парамеции Paramecium caudatum после ультрафиолетового облучения. Цитология, 5 (55) : 546—554.

Самойлова К. А. 1963а. Повышение устойчивости Paramecium caudatum к ультрафиолетовым лучам. В сб.: Реакция клетки на экстремальные воздействия, Изд. АН СССР, М.—Л. : 1=143.

Самойлова К. А. 1967. Действие ультрафиолетовой радиации на клетку. Изд. «Наука», Л. : 6—127.

Шахматов Г. Н. 1968. Применение люминесцентной микроскопии для быстрого обнаружения кровепаразитов домашних и диких животных. ДАН ТаджССР, 11 (39) : 63—65.

Hollaender A. 1955. Radiation biology. The Effect of Radiation on Protozoa and the Eggs of Invertebrates Other than Insects. N. Y.—Toronto—London : 285—322.

THE EFFECT OF ULTRAVIOLET IRRADIATION ON THE VIABILITY OF SPORES OF PLISTOPHORA SCHUBERGI AND NOSEMA AGROTIDIS

G. N. Nilova and L. V. Strelnikova

SUMMARY

Study of the effect of various doses of ultraviolet rays on the suspension of spores of *P. schubergi* and *N. agrotidis* was carried out by means of luminiscent microscopy and biological test (the ability of spores to infect caterpillars of the turnip moth). The complete death of spores was observed in no case but the increasing dose of ultraviolet irradiation caused the reduction in the lethal ability of spores. Spores of *P. schubergi* proved to be less resistant to ultraviolet irradiation than those of *N. agrotidis*.